

ANNA SKORUPSKA, JAROSŁAW KRÓL

Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii,
Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej,
Akademicka 19, 20-033 Lublin

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE POLISACHARYDY *RHIZOBIUM*: ICH ROLA W SYMBIOZIE Z ROŚLINAMI MOTYLKOWATYMI

WPROWADZENIE

Bakterie glebowe z rodzajów *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* są zdolne do indukowania brodawek wiążących azot atmosferyczny na korzeniach lub łodygach roślin z rodziny motylkowatych (*Fabaceae*). Symbioza jest procesem swoistym, jeden gatunek bakterii zakaża tylko określone gatunki roślin i tak: *Rhizobium meliloti* zakaża rośliny z rodzajów *Medicago*, *Melilotus* i *Trigonella*, *R. leguminosarum* biovar *viciae* — *Pisum*, *Lens*, *Vicia* i *Lathyrus*, a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* zakaża *Trifolium*. Rozwój brodawki jest procesem wieloetapowym, kontrolowanym zarówno przez geny bakteryjne, jak i roślinne. Od najwcześniejszych etapów symbiozy następuje wymiana sygnałów między partnerami, prowadząca do aktywacji kolejnych genów. Pierwszym sygnałem są flawonoidy wydzielane przez korzenie roślin motylkowatych, które indukują ekspresję bakteryjnych genów brodawkowania (geny *nod* i *nol* — nodulation genes) poprzez aktywację regulatorowego białka NodD. Efektem działania genów brodawkowania jest synteza czynników Nod, czyli oligosacharydów lipo-chitynowych z modyfikacjami strukturalnymi warunkującymi swoistość zakażenia. Czynniki Nod wywołują różnorodne reakcje roślinne, takie jak: skręcenie włókników korzeniowych, inicjację merystemów brodawek i uaktywnienie szeregu genów roślinnych, co w efekcie prowadzi do wytworzenia brodawki. Kolejnym etapem niezbędnym dla zaistnienia efektywnej symbiozy jest aktywacja bakteryjnych genów odpowiedzialnych za wiązanie azotu atmosferycznego (geny *nif* i *fix* — nitrogen fixation and fixation genes) (FISHER i LONG 1992).

Kluczową rolę w ustaleniu symbiozy odgrywają między innymi powierzchniowe polisacharydy *Rhizobium*. Tworzą one swoistą, wysokocząsteczkową interfazę między komórką bakteryjną i środowiskiem oraz wchodzi w złożone oddziaływania prowadzące do nawiązania efektywnej symbiozy *Rhizobium*—roślina motylkowata. Do polisacharydów powierzchniowych odgrywających istotną rolę w symbiozie należą kwaśne egzopolisacharydy (EPS), lipopolisacharydy (LPS) oraz β -1,2-glukany (GRAY i ROLFE 1990, REUBER i współaut. 1991, CARLSON i współaut. 1992, GRAY i współaut. 1992, LEIGH i COPLIN 1992, NOEL 1992, LEIGH

i WALKER 1994). Zależność między strukturą polisacharydów *Rhizobium* i efektywnością symbiozy jest złożona, zarówno ze względu na plejotropowy charakter mutacji w genach kontrolujących syntezę polisacharydów, jak i różnorodność oddziaływań między bakteriami i roślinami.

OBOJĘTNE β -1,2 GLUKANY

Szczepy *Rhizobium* tworzą cykliczne homopolimery złożone z około 20 reszt D-glukozy połączonej wiązaniami β -(1 \rightarrow 2). Te polisacharydy występują w przestrzeni peryplazmatycznej lub są wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej. Mutacje w genach *R. meliloti* oznaczonych jako *ndvA* i *ndvB* (nodule development genes) powodują rozwój nieefektywnych brodawek na lucernie. Homologiczne geny wykryte w *Agrobacterium tumefaciens* również wpływają na wirulencję szczepów. Cykliczne β -1,2-glukany prawdopodobnie umożliwiają adaptację bakterii do ciśnienia osmotycznego w komórkach roślinnych, co może mieć znaczenie w brodawkowaniu (GRAY i współaut. 1992).

LIPOPOLISACHARYDY (LPS)

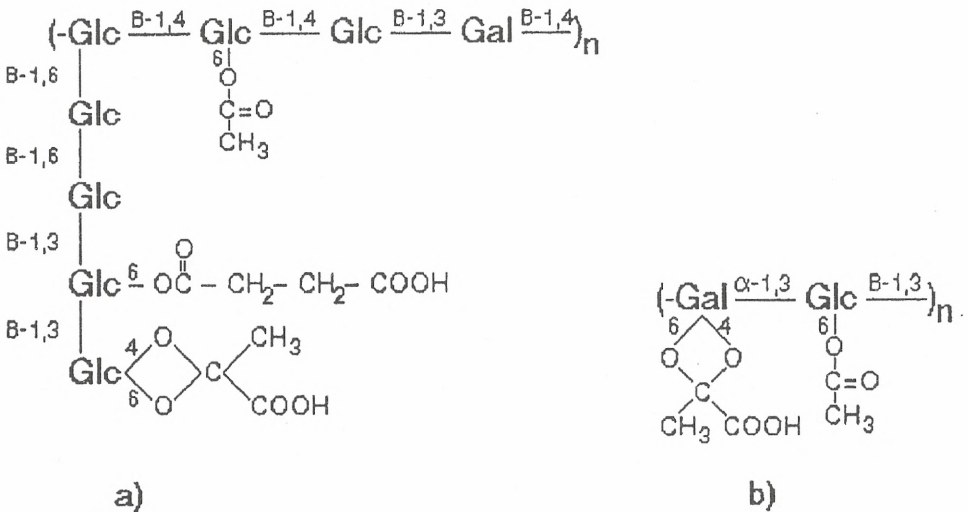
Lipopolisacharydy (LPS), w przeciwieństwie do egzopolisacharydów (EPS) i obojętnych glukanów, są integralną częścią zewnętrznej membrany bakterii. Czasteczkę LPS można podzielić na trzy funkcjonalne regiony: lipid A, oligosacharydowy rdzeń i antygen O-swoisty. Fragment rdzeniowy LPS jest połączony wiązaniem ketozydowym z hydrofobowym lipidem A, który zakotwicza czasteczkę LPS w membranie zewnętrznej. Do rdzenia LPS jest przyłączony polimorficzny region nazwany antygenem O (NOEL 1992). Ogólnie, mutanty różnych gatunków *Rhizobium* syntetyzujące zmieniony LPS są defektywne w procesie infekcji, to znaczy nie tworzą brodawek albo tworzą brodawki niekompletnie rozwinięte.

STRUKTURA EGZOPOLISACHARYDU (EPS)

EPS jest produkowany w dużych ilościach przez wiele bakterii glebowych i jest akumulowany na powierzchni komórek lub wydzielany do podłoża. Tradycyjnie uważano, że pełni nieswoistą rolę w pobieraniu składników odżywczych, przyczepianiu do podłoża, ochronie przed stresowymi czynnikami środowiska lub w patogenezie. Ostatnio wykazano, głównie dzięki izolacji szeregu mutantów *Rhizobium* defektywnych w produkcji EPS, że może również odgrywać swoistą rolę w symbiozie. *Rhizobium meliloti* jest jedynym gatunkiem *Rhizobiaceae*, w którym dokładnie poznano syntezę, a częściowo regulację syntezy EPS (TOLMASKY i współaut. 1982, REUBER i WALKER 1993, ARNOLD i współaut. 1993/1994).

R. meliloti produkuje bursztynoglukan (EPSI), który jest polimerem złożonym z ośmiocukrowych podjednostek (rys. 1). Każda z tych podjednostek zawiera po jednej reszcie bursztynianowej, pirogronianowej i octanowej, które stanowią niecukrowe modyfikacje EPSI. W obecności białego barwnika Calcofluoru, EPSI *R. meliloti* fluoryzuje w świetle UV, w odróżnieniu od EPS innych gatunków

Rhizobium. Mutanty defektywne w syntezie EPSI, lub nie zawierające acylowych modyfikacji, nie mają zdolności fluorescencji w UV (ARNOLD i współaut. 1993/1994). Biosynteza bursztynyloglukanu jest podobna do syntez innych bakteryjnych polimerów węglowodanowych, które zawierają powtarzającą się podjednostkę (TOLMASKY i współaut. 1982). Podjednostka EPSI jest syntetyzowana na nośniku lipidowym poprzez przyłączenie najpierw galaktozy, a następnie kolejnych glukozy. Po spolimeryzowaniu podjednostek EPS jest wydzielany na zewnątrz komórki. Obok EPSI *R. meliloti* może syntetyzować w warunkach głodu fosforanowego egzopolisacharyd oznaczony EPSII złożony z dwucukrowej powtarzającej się podjednostki, w której acetylowana glukoza jest połączona wiązaniem β -(1-3) z acylowaną pirogronianem galaktozą (rys. 1b) (HER i współaut. 1990). Funkcja EPSII w symbiozie nie jest wyjaśniona, lecz wiadomo, że nie może on zastępować funkcjonalnie EPSI.



Rys. 1. Struktura egzopolisacharydów *Rhizobium meliloti*: a) EPSI; b) EPSII.

R. leguminosarum obejmuje trzy biowary, które brodawkują trzy różne rośliny. *R. leguminosarum* bv. *trifolii* zakaża koniczynę, *R. leguminosarum* bv. *viciae* — wykę i groch a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* — fasolę. EPS *R. leguminosarum* ma taką samą podstawową strukturę niezależnie od biowaru. Powtarzająca się, ośmiocukrowa podjednostka zawiera pięć reszt glukozy, dwie reszty kwasu glukuronowego i jedną resztę galaktozy. W rdzeniu i łańcuchu bocznym podjednostek znajdują się podstawniki niecukrowe: grupy acetylowe, pirogronianowe oraz 3-hydroksymaślanowe, rozmieszczone w sposób charakterystyczny dla biowaru. W *R. leguminosarum* bv. *trifolii* grupy acetylowe są przyłączone do pierwszej i drugiej reszty kwasu glukuronowego rdzenia podjednostki, reszty pirogronianowe są połączone z końcową glukozą i galaktozą łańcucha bocznego, natomiast grupy 3-hydroksymaślanowe acylują galaktozę bocznego łańcucha (rys. 2) (BREEDVELD i współaut. 1993).

Przypuszczalna sekwencja aminokwasowa niektórych genów wykazała homologie do białek o znanych funkcjach, co z kolei pozwoliło na wskazanie funkcji produktów genów *exo* w biosyntezie EPSI (REUBER i WALKER 1993, LEIGH i WALKER 1994) (tab. 1).

Tabela 1
Produkty genów *exo* zgrupowanych na drugim megaplazmidzie pSymb *R. meliloti*

Gen	Lokalizacja produktu genu	Homologia	Funkcja produktu genu
<i>exoZ</i>	CM	NodX (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)	acetylotransferaza
<i>exoB</i>	CM	GalE (<i>Escherichia coli</i>)	UDP-glukozylo-4-epimeraza
<i>exoQ</i>	CM	brak	eksport EPS I i / lub polimeryzacja
<i>exoF</i>	P	ExoF (<i>Rhizobium</i> sp. NGR234)	nieznana
<i>exoY</i>	CM	CpsD (<i>Streptococcus agalactiae</i>) RfbP (<i>Salmonella typhimurium</i>)	galaktozylotransferaza
<i>exoX</i>	CM	ExoX (<i>Rhizobium</i> sp. NGR234)	negatywny regulator
<i>exoU</i>	CM	ExoA, ExoM, ExoO, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoV</i>	C	brak	transferaza pirogronianowa
<i>exoW</i>	C	ExoA, ExoM, ExoO, ExoU, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoT</i>	CM	GumJ (<i>Xanthomonas campestris</i>) NdvA (<i>Rhizobium meliloti</i>)	eksport EPS I i / lub polimeryzacja
<i>exoS</i>	P	brak	nieznana
<i>exoH</i>	CM	brak	transferaza bursztynianowa
<i>exoK</i>	P	BglA (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) LicB (<i>Clostridium thermocellum</i>)	endo-1,3 i 1,4- β -glukanaza
<i>exoL</i>	C	brak	glukozylotransferaza
<i>exoA</i>	Cm	ExoM, ExoO, ExoU, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoM</i>	C	ExoA, ExoO, ExoU, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoO</i>	C	ExoA, ExoM, ExoU, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoN</i>	C	CelA (<i>Acetobacter xylinum</i>) GtaB (<i>Bacillus subtilis</i>)	UDP-glukozylopirofosforylaza
<i>exoP</i>	CM	brak	eksport EPSI lub/i polimeryzacja

Lokalizacja: C — cytoplazma, CM — włączone lub przyłączone do membrany cytoplazmatycznej, P — przestrzeń peryplazmatyczna.

Synteza EPSI, analogicznie do biosyntezy LPS, odbywa się na zakotwiczonym w membranie wewnętrznej nośniku lipidowym (fosforan poliprenyłu). Ośmio-sacharydowe podjednostki EPS są syntetyzowane z ich urydynodwufosforanowych prekursorów (UDP-glukozy i UDP-galaktozy). W syntezie prekursora cukrowego uczestniczy gen *exoC*, który koduje fosfoglukomutazę przekształcającą glukozylo-6-fosforan w glukozylo-1-fosforan. Produktem genu *exoN* jest pirofosfo-

rylaza UDP-glukozy, katalizująca tworzenie UDP-glukozy z glukozo-1-fosforanu. Gen *exoB* koduje epimerazę UDP-glukozy, która przekształca UDP-glukozę do UDP-galaktozy. Mutanty w genach *exoB* i *exoC* są plejotropowe, ponieważ obydwa enzymy uczestniczą w syntezie prekursorów wielocukrów komórkowych: EPS, LPS i obojętnych glukanów. Galaktoza jest pierwszym cukrem przyłączanym do nośnika lipidowego przez galaktozylotransferazę kodowaną przez gen *exoY*. Swoiste glukozylotransferazy kodowane przez geny *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoO*, *exoU* i *exoW* dołączają kolejne glukozy do rosnącej ośmiocukrowej podjednostki. Podczas kompletowania podjednostki cukrowej, geny *exoZ*, *exoH* i *exoV* modyfikują podjednostkę EPSI przez dołączanie kolejno reszty acetylowej, bursztynianowej i pirogronianowej. Geny *exoP*, *exoQ* i *exoT* uczestniczą w polimeryzacji i wydzielaniu EPSI, ponieważ mutanty w tych genach akumulują wewnątrz bakterii całe podjednostki związane z nośnikiem lipidowym. Białko *ExoT* wykazuje wysoką homologię do białka GumJ *Xanthomonas campestris* wymaganego do transportu „gumy ksantanowej”, oraz częściową homologię do NdvA, białka transportującego peryplazmatyczny β -1,2-glukan w *Rhizobium meliloti* (LEIGH i WALKER 1994). Białko *ExoP* zawiera domenę odpowiedzialną za wiązanie ATP, wykrywaną w prokariotycznych i eukariotycznych białkach przenośnikowych, co wskazuje na udział tego białka w zależnym od energii procesie translokacji przez wewnętrzną membranę. Produkt genu *exoK* jako jedyny w szlaku biosyntezy EPSI wykazuje homologię do 1,3- i 1,4- β -glukanaz i przypuszczalnie odpowiada za tworzenie niskocząsteczkowego bursztynyloglukanu z pierwotnego polimeru. Mutanty w tym genie nie wykazują defektów symbiotycznych, a jedynie tworzą nieco mniej EPS.

Z przypuszczalnej sekwencji aminokwasów większości produktów białkowych genów *exo* wynika, że są to białka zasocjowane z błoną cytoplazmatyczną. Tak więc, lokalizacja nośnika prenylowego, jak i całego aparatu biosyntezy podjednostki cukrowej EPS wskazuje na rolę membrany cytoplazmatycznej w produkcji EPS. Ponieważ bursztynyloglukan jest dużą cząsteczką przypuszcza się, że polimeryzuje podczas lub po przemieszczeniu podjednostek przez błonę cytoplazmatyczną (LEIGH i WALKER 1994).

REGULACJA SYNTEZY EPSI

W regulacji syntezy EPSI bierze udział kilka genów *exo*. *ExoR* i *ExoS* negatywnie regulują syntezę wielu genów *exo* leżących na megaplazmidzie 2. Mutanty w tych genach produkują zwiększone ilości EPSI, wpływając na transkrypcję z promotora *exoYF*, lecz indukują na lucernie normalne brodawki wiążące azot — Fix^+ (GLAZEBROOK i współaut. 1989). Mutanty *exoX* tworzą trzy razy więcej EPSI niż szczep dziki. Regulacja poprzez gen *exoX* zachodzi potranslacyjnie, ponieważ sama ekspresja genu *exoX* nie ulega zmianie w mutantach. Białko *ExoX* hamuje syntezę bursztynyloglukanu poprzez interakcję z *ExoY*, pierwszą galaktozylotransferazą w szlaku biosyntezy EPSI. *ExoX* opisano także w *R. leguminosarum* oraz w *Rhizobium* NGR234 jako *PsiA* (BORTHAKUR i współaut. 1988, GRAY i współaut. 1990).

Ilość EPS syntetyzowanego przez *Rhizobium* wzrasta w warunkach głodu fosforowego lub azotowego, lecz nie wiadomo jaką w tych warunkach pełnią funkcję produkty genów regulatorowych.

FUNKCJA EPS W SYMBIOZIE

EPS, ze względu na swoją lokalizację na zewnątrz komórki bakteryjnej, jak również heterogenność struktury chemicznej, jest rozważany jako specyficzna cząsteczka sygnałna w symbiozie. Pierwsze dobrze scharakteryzowane mutanty *R. meliloti* defektywne w syntezie EPS indukowały nieefektywne brodawki na lucernie (LEIGH i COPLIN 1992). Brodawki były poronne, bez nici infekcyjnych i bakteroidów, co wskazywało wyraźnie na defekt w zakażeniu komórek roślinnych przez rizobia. W roślinach zakażonych mutantami Exo^- występowały tylko 2 z 18 nodulin (białka roślinne powstające w odpowiedzi na zakażenie rizobiami). Fenotyp mutantów Exo^- *R. meliloti* (Nod^+ Fix^- wskazywał, że EPS nie może być pierwotnym sygnałem interakcji bakterii z rośliną ani też sygnałem determinującym swoistość symbiozy, lecz cząsteczką istotną w fazie inwazji, kiedy bakterie uwalniają się z nici infekcyjnych penetrujących komórki epidermy (LEIGH i WALKER 1994). EPS jest również niezbędny dla rozwoju efektywnej symbiozy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną (CHAKRAVORTY i współaut. 1982, DERYŁO i współaut. 1986, SKORUPSKA i współaut. 1991), *R. leguminosarum* bv. *viciae* z grochem (BORTHAKUR i JOHNSTON 1986) oraz *Rhizobium* NGR234 z *Leucaena leucocephala* (CHEN i współaut. 1985). EPS nie jest niezbędny w symbiozie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z fasolą, *Bradyrhizobium japonicum* lub *R. fredii* z soją (PARNISKE i współaut. 1993).

EPS wydaje się oddziaływać na różnych etapach rozwoju brodawki w zależności od układu symbiotycznego. Mutanty *exo* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* indukują dwojakiego typu nieefektywne brodawki na koniczynie (SKORUPSKA i współaut. 1995, BIAŁEK i współaut. 1995). Niektóre mutanty tworzyły „puste”, niezakażone brodawki, bez nici infekcyjnych i bakteroidów, podobne do brodawek tworzonych na lucernie przez nieinfekcyjne Exo^- mutanty *R. meliloti*. Druga liczniejsza grupa Exo^- mutantów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tworzyła brodawki zakażone, w których można było obserwować powiększone nici infekcyjne upakowane bakteroidami, oraz komórki roślinne również wypełnione szybko degenerującymi bakteroidami. Ultramikroskopowe badania bakteroidów wykazują znaczne zmiany morfologiczne; bakteroidy są mniejsze, nieregularnego kształtu i silnie wybarwione. W zakażonych i niezakażonych komórkach roślinnych są widoczne duże ziarna skrobi, co świadczy o zwolnionym metabolizmie komórek roślinnych zakażonych mutantami defektywnymi w syntezie EPS. Podczas gdy nieinfekcyjne Exo^- mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* są przypuszczalnie zmutowane w genach *exo* wpływających na wczesne etapy infekcji koniczyny, mutanty indukujące zakażone brodawki mają defekty w genach uczestniczących w dalszych stadiach rozwoju symbiozy, co pozwala na częściowy rozwój brodawki. Bez względu na stopień rozwoju brodawki, koniczyna zakażona mutantami Exo^- wykazuje efekt głodu azotowego (SKORUPSKA i współaut. 1995). W brodawkach indukowanych przez mutanty Exo^- , hybrydyzacja *in situ* nie

wykazała obecności transkryptów genu *nifH*, co oznacza brak syntezy nitrogenazy, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za redukcję N_2 (BIAŁEK i współaut. 1995). Bakteroidy wykazują zmienioną morfologię od chwili uwolnienia z nici infekcyjnej i nigdy nie osiągają stanu dojrzałości pozwalającego na ekspresję genów odpowiedzialnych za redukcję azotu atmosferycznego. Mutacje transpozonowe prowadzące do fenotypu Exo^- zlokalizowano na niesymbiotycznych megaplazmidach *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz na chromosomie (SKORUPSKA i współaut. 1991, 1995).

W *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* opisano regulatorowe geny *exo*, oznaczone *psi* (polysaccharide inhibition), które wyklonowane na wielokopiowym plazmidzie i wprowadzone do odpowiedniego gospodarza hamowały produkcję EPS. Geny *psiA* (homologia do *exoX* *R. meliloti*) i *psiB* zlokalizowano wyjątkowo na plazmidzie symbiotycznym jako geny sprzężone z genami *nod* i *nif* (BORTHAKUR i JOHNSTON 1987). Mutanty w tych genach syntetyzują normalną ilość EPS, lecz indukują na fasoli brodawki nie wiążące azotu, co wskazuje, że ciągła synteza EPS w brodawkach wpływa negatywnie na ich rozwój. Normalnie funkcjonujące geny *psi* prawdopodobnie hamują syntezę EPS w trakcie rozwoju brodawki, ponieważ bakteroidy wewnątrz brodawek mają niewiele lub wogóle nie mają EPS. Fuzja promotora genu *psi* *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z genem dla β -glukuronidazy wykazała intensywną transkrypcję tego genu tylko w bakteroidach. Takie same mutanty *R. meliloti* nie wpływają na symbiozę z lucerną. Około 13 kpz od genów *psi*, na plazmidzie symbiotycznym zidentyfikowano gen oznaczony *psr* (polysaccharide restoration), który hamował transkrypcję genu *psi* (BORTHAKUR i JOHNSTON 1987, LATCHFORD i współaut. 1991). Mutanty w genie *psr* indukowały jednak normalne, Fix^+ , brodawki na fasoli. Sekwencja aminokwasowa PsrA wskazuje, że jest to transkrypcyjny regulator wiążący się z DNA.

Obok genów regulatorowych w *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* opisano geny *pss1* (polysaccharide synthesis) i *pss2* (homologiczny do *exoY* *R. meliloti* i *exoY* *Rhizobium* sp. NGR234), leżące poza plazmidem symbiotycznym. Mutacje w genach *pss/exoY* powodują zahamowanie syntezy EPS w *R. meliloti*, *Rhizobium* sp. NGR234 oraz w obu biowarach *R. leguminosarum* bv. *viciae* i *phaseoli*. Podczas gdy mutanty *pss* *R. leguminosarum* bv. *viciae* nie zakażają wyki i grochu, takie same mutanty *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* tworzą wiążące azot brodawki na fasoli (BORTHAKUR i JOHNSTON 1986). Tak więc fenotyp symbiotyczny mutacji zależał od rośliny, jaką zakażał szczep *Rhizobium*, a właściwie od typu brodawki jaką tworzyła roślina. Brodawki okrągłe, o krótko funkcjonującym merystemie (tzw. zdeterminowane), powstające z zawiązka w zewnętrznej strefie kory korzenia są tworzone przez takie rośliny, jak fasola, soja i komonica. Brodawki tego typu nie wydłużają się lecz zwiększają objętość, a bakterie w zakażonych komórkach różnicują się do bakteroidów wiążących azot. Brodawki wydłużone, o stale aktywnym merystemie powstające z zawiązka w wewnętrznej strefie kory korzenia (tzw. niezeterminowane) tworzą takie rośliny, jak lucerna, groch, koniczyna, wyka czy tropikalna *Leucaena*. Obecność EPS w zakażającym *Rhizobium* jest zasadniczo istotna tylko w roślinach tworzących brodawki niezeterminowane. Mutanty Exo^- tworzą defektywne brodawki na lucernie, koniczynie, grochu, wyce, ale efektywnie brodawkują fasolę, soję i komonicę. Szczególnie wyraźną zależność między mutacją *exo* i rośliną można obserwować na *R. loti*,

który zakaża szereg roślin tworzących zarówno brodawki zdeterminowane (*Lotus*), jak i niezdeterminowane (*Leucaena*). Te same mutanty Exo^- *R. loti* indukują poronne Fix^- brodawki na *Leucaena* i Fix^+ na *Lotus* (HOTTER i SCOTT 1991). Być może różnice w wymaganiach co do EPS wynikają z różnic w funkcji EPS w morfogenezie brodawek zdeterminowanych i niezdeterminowanych. Niezdeterminowane brodawki mają więcej nici infekcyjnych i bakterie rozprzestrzeniają się do nowych komórek roślinnych poprzez rozgałęzienie i wzrost nici infekcyjnej. EPS może tworzyć ważny komponent matriks wypełniającej nić infekcyjną.

Funkcja EPS w symbiozie wydaje się jednak daleka od wyjaśnienia, na co wskazują wyjątki z opisanego powyżej uogólnienia. *Hedysarum coronarium* zakażona mutantem *exoB* *Rhizobium* sp., tworzy niezdeterminowane brodawki normalnie wiążące azot (OLLERO i współaut. 1994). Mutacja *exoB* wprowadzona do szczepu *Bradyrhizobium japonicum* wprawdzie nie hamuje procesu infekcji soi (*Glycine max*), jak w roślinach o niezdeterminowanym typie brodawek, ale powoduje opóźnienie brodawkowania, co wpływa na konkurencyjność szczepu (PARNISKE i współaut. 1994).

Na funkcję EPS w symbiozie niewątpliwie ma również wpływ swoista niewęglowodanowa modyfikacja powtarzającej się podjednostki. Mutanty *exo* *R. meliloti*, które syntetyzują EPSI pozbawiony reszt bursztynianowych (*exoH*) czy pirogronianowych (*exoV*), tworzą nieefektywne brodawki na lucernie (LEIGH i COPLIN 1992). Natomiast brak grup acetylowych w EPSI nie wpływa na efektywność symbiozy (REUBER i WALKER 1993a). W innych gatunkach *Rhizobium* nie są znane geny kontrolujące modyfikację EPS. W *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i bv. *viciae* EPS pozbawiony grup acylowych, podany na roślinę przed zakażeniem dzikim szczepem, nie hamował brodawkowania w odróżnieniu od normalnego EPS. Wskazuje to, że modyfikacja EPS może mieć znaczenie również w symbiozie rizobiów z koniczyną i wyką (SKORUPSKA i współaut. 1985).

Czynniki Nod oraz EPS są syntetyzowane niezależnie, ale mogą współdziałać w tworzeniu brodawki. Świadczą o tym doświadczenia, w których wspólne zakażenie *Leucaena*, lucerny, grochu lub koniczyny mutantami Nod^-Exo^+ i Nod^+Exo^- prowadziło do powstania normalnych, zakażonych bakteriami brodawek (KAPP i współaut. 1990, GRAY i współaut. 1992, SKORUPSKA i KRÓL 1995). O swoistości oddziaływania EPS na symbiozę świadczy też możliwość supresji defektywnego fenotypu symbiotycznego mutantów *exo* *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *Rhizobium* sp. NGR 234 przez dodanie mikromolowych stężeń homologicznego EPS na korzenie roślin przed zakażeniem (GRAY i współaut. 1992, SKORUPSKA i KRÓL 1995). W przypadku nieinwazyjnych mutantów *exo* *R. meliloti* do utworzenia zakażonych brodawek lucerny niezbędna jest czterocukrowa, w pełni zmodyfikowana podjednostka bursztynyloglukanu (BATTISTI i współaut. 1992). Brak grup bursztynianowych jest skorelowany z występowaniem EPS tylko w formie wysokocząsteczkowej co sugeruje, że ich występowanie jest istotne dla cięcia polimeru EPS na czterocukrowe, sygnałne podjednostki. Te doświadczenia uprawniają do wniosku, że EPS lub jego pochodne, działa jako swoisty sygnał w tworzeniu i rozwoju nici infekcyjnych (lucerna) lub w uwalnianiu bakteroidów z nici infekcyjnych (koniczyna). Podsumowując, można stwierdzić, że synteza swoście zmodyfikowanego EPS, o odpowiednim stopniu polimeryzacji jest niezbędna do rozwoju wiążącej azot brodawki, aczkolwiek rodzaj

strukturalnej modyfikacji egzopolisacharydu oraz jego ciężar cząsteczkowy wymagany dla efektywnej symbiozy nie jest znany dla większości gatunków *Rhizobium*.

Obserwacje ultrastrukturalne brodawek lucerny wykazują obecność w obrębie nici infekcyjnych elektrono-gęstego materiału, który przypuszczalnie jest egzopolisacharydem. Matriks zanika w miarę dojrzewania bakteroidów. Fuzja genów biosyntezy EPS (*exoY* i *exoF*) z genem dla fosfatazy alkalicznej wykazała aktywność promotorów *exo* tylko w strefie inwazji, tuż za merystem brodawki i zupełny brak aktywności transkrypcyjnej w strefie wiązania azotu przez bakteroidy (GRAY i współaut. 1992). Obok genów regulatorowych *exo* (*exoR* i *exoS*), również geny plazmidowe odpowiedzialne za brodawkowanie — *syra*, *syrM* i *nodD3* *R. meliloti* negatywnie kontrolują syntezę EPS (FISHER i LONG 1992).

Jedna z hipotez dotycząca roli EPS w symbiozie rizobiów z roślinami tworzącymi brodawki niezdeteminowane, częściowo tylko udokumentowana, mówi o działaniu EPS jako supresora systemu obronnego rośliny. Analiza elektronomikroskopowa pseudobrodawek indukowanych przez mutantą *Exo⁻ R. meliloti* 0540 wykazała nienormalne zgrubienie ścian komórkowych, wysyconych substancjami fenolowymi i ulegającymi lignifikacji, podobnie jak obserwowano w infekcji roślin patogenami grzybowymi (NIEHAUS i współaut. 1993). Zgrubienia ścian komórek merystemu, jak również występowanie osmofilnych struktur w tkance peryferyjnej brodawek indukowanych przez *Exo⁻* mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na koniczynie przypisuje się również reakcji obronnej rośliny na zakażenie (SKORUPSKA i współaut. 1995). W systemie symbiotycznym *Bradyrhizobium japonicum* — soja (*Glycine max*), mutanty *exoB*, aczkolwiek indukowały wiążące azot brodawki (zdeteminowane), powodowały znaczny spadek zdolności konkurencyjnych szczepu. Wkrótce po infekcji można było obserwować akumulację fitoaleksyn oraz znaczne zgrubienie ścian komórkowych prowadzące do zlokalizowanego obumierania komórek charakterystycznego dla reakcji nadwrażliwości roślin broniących się przed infekcją patogenów (PARNISKE i współaut. 1993, 1994).

W terminologii fitopatologicznej mutanty *Exo⁻ R. meliloti* są awirulentne, mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* są albo awirulentne albo wykazują zredukowaną wirulencję podobnie jak mutanty *Exo⁻* fitopatogennych bakterii, takich jak *Erwinia stewartii*, *E. amylovora*, *Xanthomonas campestris* i *Pseudomonas solanacearum* (COPLIN i COOK 1990). Opierając się na analogii do fitopatogennych interakcji można postawić hipotezę, że EPS w interakcji rizobiów z roślinami tworzącymi niezdeteminowany typ brodawki (a także prawdopodobnie typ zdeteminowany) działa jak supresor reakcji obronnych rośliny, co ułatwia zajście zgodnych interakcji — wyróżnicowania bakteroidów i redukcji azotu atmosferycznego. Nadal nie jest znana molekularna natura receptora dla cząsteczki supresora reakcji obronnych rośliny. Hipotetycznym receptorem mogłyby być lektyny roślinne, których funkcja w symbiozie jest dotychczas mało poznana (NIEHAUS i współaut. 1993). Istnienie takiego receptora wymagałoby rozważenia mechanizmu przekazywania sygnału w roślinie umożliwiającego inwazję brodawki i rozwój bakteroidów.

RHIZOBIUM EXOPOLYSACCHARIDES: THEIR ROLE IN SYMBIOSIS WITH LEGUME PLANTS

Summary

The symbiosis between bacteria of the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* and specific plants of the family *Fabaceae* plays an important role in the ecological nitrogen balance in nature. The symbiosis between microsymbiont and legume is very specific and complex both on the chemical and on the genetic level. The plant — microbe interactions result in formation of a highly organized structure called nodule, in which nitrogen fixation takes place. It is evident that in the genus *Rhizobium* surface polysaccharides are involved in the infection process and nodule development on legume plants. Here we summarize recent data on identification and analysis of the surface polysaccharide genes of *Rhizobium* and their role in symbiosis with legumes.

LITERATURA

- ARNOLD W., BECKER A., KELLER M., ROXLAU A., PÜHLER A., 1993/1994. *The role of Rhizobium meliloti surface polysaccharides in the infection of Medicago sativa*. Endocytobiosis & Cell Res. 10, 17–28.
- BATTISTI L., LARA J. C., LEIGH J. A., 1992. *Specific oligosaccharide form of the Rhizobium meliloti exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5625–5629.
- BIALEK U., SKORUPSKA A., YANG W. -C., BISSELING T., VAN LAMMEREN A. A. M., 1995. *Disturbed gene expression and bacteroid development in Trifolium pratense root nodules induced by Tn5 mutants of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii defective in polysaccharide synthesis*. Planta 197, 184–192.
- BORTHAKUR D., JOHNSTON A. W. B., 1986. *A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum but not of beans by R. phaseoli and is not corrected by cloned DNA Rhizobium or the cytopathogen Xanthomonas*. Mol. Gen. Genet. 203, 320–323.
- BORTHAKUR D., JOHNSTON A. W. B., 1987. *Sequence of psi, a gene on the symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli which inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by psr, another gene on the symbiotic plasmid*. Mol. Gen. Genet. 207, 149–154.
- BORTHAKUR D., BARKER R. F., LATCHFORD J. W., ROSSEN L., JOHNSTON A. W. B., 1988. *Analysis of pss genes of Rhizobium leguminosarum required for exopolysaccharide synthesis and nodulation of peas: their primary structure and their interaction with and other nodulation genes*. Mol. Gen. Genet. 213, 155–162.
- BREEDVELD M. W., HAYO C. J., CRAMERS C., BATLEY M., POSTHUMUS M. A., ZEVENHUIZEN L. P. T. M., WIJFFELMAN C. A., ZEHNDER A. J. B., 1993. *Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 175, 750–757.
- CARLSON R. W., BHAT U. R., REUHS B., 1992. *Rhizobium lipopolysaccharides; their structures and evidence for their importance in the nitrogen-fixing symbiotic infection of their host legumes*. [W:] P. M. GRESSHOFF (red.) Current Topics in Plant Molecular Biology 33–44.
- CHAKRAVORTY A. K., ŻURKOWSKI W., SHINE J., ROLFE B. G., 1982. *Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of Rhizobium genes involved in exopolysaccharide synthesis and effective nodulation*. J. Mol. Appl. Genet. 1, 585–596.
- CHEN H., BATLEY M., REDMOND J., ROLFE B. G., 1985. *Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range Rhizobium due to changes in exopolysaccharide synthesis*. J. Plant Physiol. 120, 331–349.
- COPLIN D. L., COOK D., 1990. *Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 271–279.
- DERYŁO M., SKORUPSKA A., BEDNARA J., LORKIEWICZ Z., 1986. *Rhizobium trifolii mutants deficient in exopolysaccharide production*. Physiol. Plant. 66, 699–704.
- FISHER R. F., LONG S. R., 1992. *Rhizobium — plant signal exchange*. Nature 357, 655–659.
- GLAZEBROOK J., REED J., REUBER T. L., WALKER G., 1989. *Genetic analysis of Rhizobium meliloti exopolysaccharides*. Int. J. Biol. Macromol. 12(2), 67–70.

- GRAY J. X., DJORDJEVIC M. A., ROLFE B. G., 1990. *Two genes that regulate exopolysaccharide production in Rhizobium sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes*. J. Bacteriol. 172, 193-203.
- GRAY J. X., ROLFE B. G., 1990. *Exopolysaccharide production in Rhizobium and its role in invasion*. Mol. Microbiol., 4, 1425-1431.
- GRAY J. X., de MAAGD R. A., ROLFE B. G., JOHNSTON A. W. B., LUGTENBERG B. J. J., 1992. *The role of the Rhizobium cell surface during symbiosis*. [W:] D. P. S. VERMA (red.) *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications* CRC Press, Boca Raton, 360-376.
- HER G. R., GLAZEBROOK J., WALKER G. C., REINHOLD V. N., 1990. *Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of Rhizobium meliloti strain 1021*. Carbohydr. Res. 198, 305-312.
- HOTTER G. S., SCOTT D. B., 1991. *Exopolysaccharide mutants of Rhizobium loti are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host*. J. Bacteriol. 173, 851-859.
- KAPP D., NIEHAUS K., QUANDT J., MÜLLER P., PÜHLER A., 1990. *Cooperative action of Rhizobium meliloti nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected nodules*. Plant Cell 2, 139-151.
- LATCHFORD J. W., BORTHAKUR D., JOHNSTON A. W. B., 1991. *The products of Rhizobium genes, psi and pss, which affect exopolysaccharide production, are associated with the bacterial cell surface*. Mol. Microbiol. 5, 2107-2114.
- LEIGH J. A., COPLIN D. L., 1992. *Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions*. Annu. Rev. Microbiol. 46, 307-346.
- LEIGH J. A., WALKER G., 1994. *Exopolysaccharides of Rhizobium: synthesis, regulation and symbiotic function*. TIG 10, 63-67.
- NIEHAUS K., KAPP D., PÜHLER A., 1993. *Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPSI)-deficient Rhizobium meliloti mutant*. Planta 190, 415-425.
- NOEL K. D., 1992. *Rhizobial polysaccharides required in symbioses with legumes*. [W:] D. P. S. VERMA (red.), *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, CRC Press, Boca Raton, 341-357.
- OLLERO F. J., VALVERDE M. A., SANCHEZ-PALAZON L., VILLALOBO E., ESPUNY M. R., BELLOGIN R. A., 1994. *An exoB mutant of Rhizobium sp. is effective in indeterminate nodules of Hedysarum coronarium*. Microbiology 140, 1389-1394.
- PARNISKE M., KOSCH K., WERNER D., MÜLLER P., 1993. *ExoB mutants of Bradyrhizobium japonicum with reduced competitiveness for nodulation of Glycine max*. MPMI 6, 99-106.
- PARNISKE M., SCHMIDT P. E., KOSCH K., MÜLLER P., 1994. *Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective exoB mutants of Bradyrhizobium japonicum*. MPMI 7, 631-638.
- REUBER T. L., REED J., GLAZEBROOK J., GLUCKSMAN M. A., AHMANN D., WALKER G. C., 1991. *Rhizobium meliloti exopolysaccharides: genetic analyses and symbiotic importance*. Biochem. Soc. Trans. 19, 636-641.
- REUBER T. L., WALKER G. C., 1993. *Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of Rhizobium meliloti*. Cell 74, 269-280.
- REUBER T. L., WALKER G. C., 1993a. *The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by Rhizobium meliloti Rm1021*. J. Bacteriol. 175, 3653-3655.
- SKORUPSKA A., BIAŁEK U., URBANIK-SYPNIEWSKA T., VAN LAMMEREN A., 1995. *Two types of nodules induced on Trifolium pratense by mutants of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii deficient in exopolysaccharide production*. J. Plant Physiol. (w druku).
- SKORUPSKA A., DERYŁO M., LORKIEWICZ Z., 1985. *Role of noncarbohydrate substitutions of Rhizobium exopolysaccharide in nodulation process*. Arch. Microbiol. 143, 307-310.
- SKORUPSKA A., DERYŁO M., GOLINOWSKI W., 1991. *The region for exopolysaccharide synthesis in Rhizobium leguminosarum biovar trifolii is located on the non-symbiotic plasmid*. Acta Biochim. Polon. 38, 423-435.
- SKORUPSKA A., KRÓL J., 1995. *Nodulation response of exopolysaccharide deficient mutants of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii to addition of acidic exopolysaccharide*. Microbiol. Res. 150, 297-303.
- TOLMASKY M. E., STANELONI R. J., LELOIR L. F., 1982. *Lipid-bound saccharides in Rhizobium meliloti*. J. Biol. Chem. 257, 6751-6757.